

УДК 633.16:224.234

БІЛИНЬСЬКА О.В.<sup>1</sup>, ДУЛЬНІВ П.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,  
Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

<sup>2</sup> Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України,  
Україна, 02160, м. Київ, Харківське шосе, 50, e-mail: selit@ua.fm

## ВПЛИВ ГЕЛЕУТВОРЮЮЧОГО КОМПОНЕНТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО (*HORDEUM VULGARE* L.) У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

За масового одержання андрогенних ліній подвоєних гаплоїдів для прискорення селекційного процесу важливим завданням є забезпечення високої частоти регенерації рослин у якомога більшої кількості гібридних популяцій. Це досягається як за рахунок удосконалення технології гаплопродукційного процесу [1, 2], так і шляхом залучення гібридів, створених за участі чутливих до андрогенезу *in vitro* батьківських форм [3].

Оскільки найбільший регенераційний потенціал мають ембріоїди – біполярні структури із спряженим розвитком стеблового і кореневого апексів, що нагадують будовою зиготичні зародки [4], на стимулювання прямого ембріодогенезу чи утворення ембріогенного калюсу спрямовані головним чином дослідження з оптимізації режимів вирощування, попередньої обробки рослинного матеріалу та складу живильних середовищ для культивування пиляків і морфогенних структур мікроспоріального походження [5, 6].

Нами вперше встановлено позитивний вплив на ембріодогенез і регенерацію у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю заміни агар-агару на хімічно модифіковані крохмалі [7, 8], природні кукурудзяні крохмалі з підвищеним вмістом амілози, отримані з зерна ліній-носіїв рецесивних мутацій *ae* і *su<sub>2</sub>* [9, 10], та зернові крохмалі гороху [11]. Застосування цих гелеутворювачів є інноваційним елементом технології, який забезпечує більш повну реалізацію морфогенного потенціалу пилякової культури на тлі істотного зниження вартості живильного середовища, а отже і вартості кінцевого продукту – ліній подвоєних гаплоїдів.

Метою цього дослідження, проведеного в рамках програми зі створення вітчизняного гелеутворюючого компонента живильних середовищ з високими технологічними характеристиками і низькою вартістю, була оцінка ефективності використання у складі живильного середовища для культивування *in vitro* пиляків ячменю ярого удосконаленого

препарату хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ і визначення перспектив його застосування для масового отримання гаплоїдів.

### Метеріали і методи

Методичні дослідження було проведено із залученням еталонних за здатністю до андрогенезу *in vitro* генотипів: лінії ячменю ярого ДГ00-126, якій притаманна висока здатність до продукування ембріоїдів і рослин-регенерантів, та сорту Фенікс з стабільно низьким рівнем прояву ознак культурабельності.

Для отримання андрогенних гаплоїдів було використано F<sub>1</sub> гібридів п'яти комбінацій схрещування нових сортів української селекції з лініями-носіями гена *ix*, дібраними за результатами цитологічного аналізу зрілого пилку, забарвленого розчином йоду, із зразка GSHO18288193444, наданого Національним центром генетичних ресурсів рослин України.

Рослини-донори пиляків вирощували у польових умовах. Вегетаційний період 2013 р. був вкрай несприятливим для росту і розвитку ячменю ярого і характеризувався практично повною відсутністю опадів у фазі сходи, кушіння, вихід у трубку. Збереження рослин і можливість проведення експериментів були забезпечені виключно за рахунок штучного поливу, починаючи з фази кушіння.

Добір колосся, попередню обробку і отримання асептичної культури здійснювали за власними методичними розробками [12]. Базове індукційне середовище, яке слугувало контролем, і середовище для отримання рослин-регенерантів [9] містили 0,8 % агар-агару «Difco» (США). У дослідних варіантах індукційного середовища агар-агар було замінено на хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ, отриманий за удосконаленою технологією в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ. Цей препарат було додано до живильного середовища у концентраціях 6,0 і 12,0 %.

Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю

морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загального числа культивованих пиляків. Експериментальні дані було оброблено за допомогою методів варіаційної статистики з використанням пакету програм Microsoft Office (Excel 2003).

### Результати та обговорення

Дослідження показали, що хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ мав покращені технологічні властивості порівняно з препаратом Д-5а [8]. Зокрема, він характеризувався утворенням більш рідкого клейстеру та наявністю більшої водоутримуючої здатності. Окрім того, з крохмалю Д-5аМ було отримано гель придатної для інокуляції пиляків щільності не лише у концентрації 12,0 %, й 6,0 %, хоча в остатньому випадку істотно збільшувалася тривалість гелеутворення.

Результати досліджень дають підставу для твердження про позитивний вплив двох концентрацій цього гелеутворювача на частоту

індукції морфогенних структур у обох генотипів, а у сорту Фенікс і на ефективність регенерації зелених рослин (рис. 1).

Зокрема, у лінії ДГ00-126 мало місце зростання кількості морфогенних пиляків на середовищі, яке містило 12,0 % крохмалю Д-5а-М, майже на 16 % за тенденції до збільшення цього показника на середовищі з меншою концентрацією препарату. У сорту Фенікс відмічено зростання кількості морфогенних пиляків в середньому на 10 %, і майже на таку ж величину збільшилася частота регенерації зелених рослин. Як і у раніше проведених експериментах з дослідження впливу природи гелеутворювача на ефективність індукції гаплоїдів ячменю ярого, мало місце проростання ембріодів на індукційному середовищі, хоча на середовищах, які містили крохмаль, цей процес відбувався менш інтенсивно, ніж на агаровому середовищі (рис. 2).

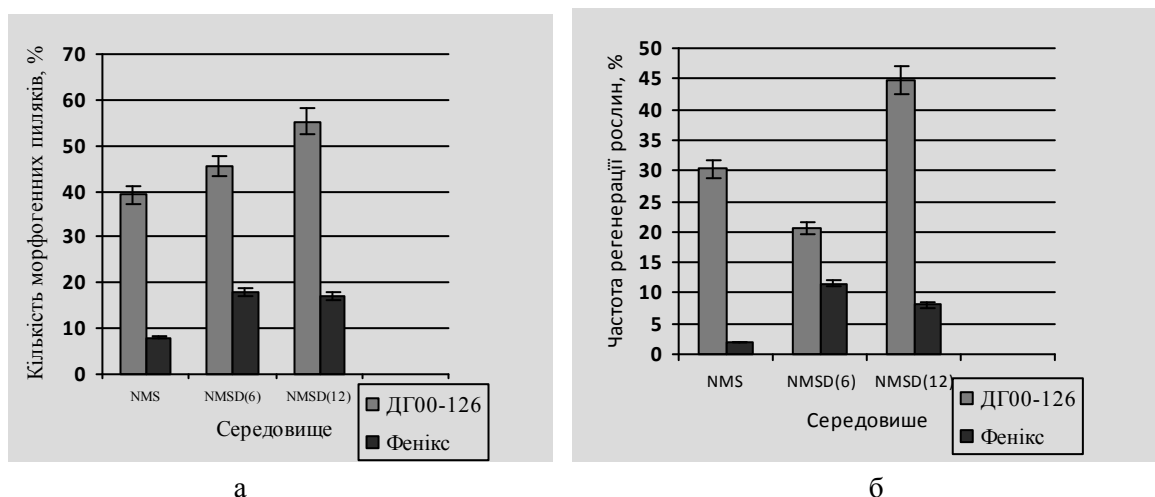


Рис. 1. Утворення морфогенних структур (а) і регенерація рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ячменю ярого на живильних середовищах, які містили в якості гелеутворювача: NMS – агар-агар (0,8%, «Difco», США); NMSD(6) – хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ (6,0 %); NMSD (12) – хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ (12,0 %)



NMS NMSD(6) NMSD(12)

Рис. 2. Утворення морфогенних структур і регенерація зелених рослин у культурі пиляків *in vitro* ячменю ярого залежно від природи гелеутворювача живильного середовища і його концентрації (позначення ті ж, що і на рис. 1)

У сорту Фенікс проростання ембріодів було відмічено лише на середовищі, яке містило 6,0 % крохмалю Д-5аМ. Переважна більшість рослин була отримана при перенесенні андрогенних структур на регенераційне середовище з агаром.

Зростання показників гаплопродукції на середовищі з крохмалем Д-5а було підтверджено на гібридному матеріалі. Як свідчить аналіз результатів, узагальнених у таблиці, за меншої кількості висаджених пиляків у дослідному варіанті було отримано однакову або більшу кількість рослин, ніж у контролі. Середня частота морфогенних пиляків зростає з  $(29,89 \pm 0,96) \%$  до  $(38,05 \pm 1,49) \%$ . При цьому лише в одній комбінації за цим показником перевищення було істотним, а в інших, за винятком комбінації схрещування GSHO-2(их) / Модерн, виявлено очевидну тенденцію до збільшення інтенсивності андрогенезу *in vitro* під впливом крохмалю.

За основним показником ефективності пилякової культури – частотою регенерації зелених рослин – істотну різницю відмічено у всіх комбінаціях за винятком GSHO-4(их) / Модерн. Середня частота регенерації зелених рослин на середовищі з хімічно модифікованим крохмалем становила  $(16,62 \pm$

1,14)%, що було на 10% вище, ніж у контролі. Максимальний вихід морфогенних пиляків  $(57,62 \pm 2,88) \%$  і зелених рослин-регенерантів  $(31,52 \pm 2,70) \%$  отримано у комбінації схрещування GSHO-5(их) / ДГ00-126, де батьківською формою слугувала чутлива до андрогенезу *in vitro* лінія (табл.).

Особливістю гібридів, залучених до експерименту, була присутність у їх родоводі сортів Вакула, Модерн і лінії ДГ00-126, які мають високу здатність до андрогенезу *in vitro* (у сорту Модерн було отримано на середовищі з крохмалем Д-5а більше 70, а у ДГ00-126 біля 90 зелених рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків), та ліній-носіїв гена *их*, дібраних із низько чутливого до процедури культивування пиляків зразка. Високі донорські властивості щодо кількості морфогенних пиляків і регенерації рослин зберегла лише лінія ДГ00-126. У комбінаціях схрещування з сортами Вакула і Модерн мало місце домінування низької здатності до регенерації зелених рослин *их*-ліній, що свідчить про різнонаправлене домінування та необхідність створення донорів гена *их* з високою здатністю до андрогенезу *in vitro* з метою їх подальшого використання у програмах галюїдної селекції на поліпшену якість зерна.

Таблиця. Здатність до андрогенезу *in vitro* ячменю ярого в залежності від природи гелеутворювача індукційного живильного середовища і гібридної комбінації (2013 р.)

Комбінація схрещування	Гелеутворювач	Висаджено пиляків, шт.	Отримано			
			морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
			шт.	%	шт.	%
F <sub>1</sub> GSHO-4 (их) / Вакула	агар-агар	464	106	22,84±1,95	16	3,45±0,85
	Д-5аМ	144	47	32,64±3,91	17	11,81±2,68*
F <sub>1</sub> GSHO-5(их) / ДГ00-126	агар-агар	407	166	40,79±2,44	58	14,25±1,73
	Д-5аМ	295	170	57,62±2,88**	93	31,52±2,70**
F <sub>1</sub> GSHO-2(их) / Модерн	агар-агар	398	140	35,18±2,39	26	6,53±1,24
	Д-5аМ	110	31	28,18±4,29	20	18,18±3,68*
F <sub>1</sub> Модерн /GSHO-2(их)	агар-агар	609	178	29,23±1,84	36	5,91±0,95
	Д-5аМ	248	80	32,64±2,98	32	12,90±2,13*
F <sub>1</sub> GSHO-4(их) / Модерн	агар-агар	393	89	22,64±2,11	16	4,07±1,00
	Д-5аМ	262	75	28,63±2,79	14	5,34±1,39
Всього	агар-агар	2271	679	—	152	—
	Д-5аМ	1059	403	—	176	—
Середнє	агар-агар	—	—	29,89±0,96	—	6,69±0,52
	Д-5аМ	—	—	38,05±1,49*	—	16,62±1,14**

Примітки:

- \*різниця істотна при  $P \leq 0,05$ ; \*\* різниця істотна при  $P \leq 0,01$ ;
- базовим слугувало середовище NMSмод2. Середовища містили 0,8 % агар-агару «Difco» (США) і 12,0 % хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ.

Загалом за культивування 3330 пиляків, вилучених з колосся F<sub>1</sub> гібридів п'яти комбінацій схрещування, отримано 328 нормально пігментованих рослин-регенерантів, які вирощено до фази повної стиглості в умовах штучного клімату для одержання насіннєвого потомства.

Трудові затрати щодо інокуляції на живильне середовище такої кількості пиляків становили 3 робочі дні одного працівника.

#### **Висновки**

Хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ має поліпшені порівняно з препаратом Д-5а

технологічні характеристики, зокрема, утворений ним гель має кращі водоутримуючу здатність та структурно-механічні властивості. Крохмаль Д-5аМ в разі його використання у складі живильного середовища для культивування *in vitro* пиляків ячменю ярого стимулює прямий ембріодогенез і підвищує частоту регенерації рослин. Препарат є перспективним для використання у біотехнології рослин як значно дешевший та ефективніший за агар-агар гелеутворювач живильного середовища для культури пиляків *in vitro* ячменю ярого.

#### **Література**

1. Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production haploid in frequencies sufficient for barley breeding programs // *Plant Cell Rept.* – 1989. – 8. – P. 78–81.
2. Devaux P., Kasha K.J. Overview of barley doubled haploid production // *Advances in haploid production in high plants* / Ed. A. Touraev, B.P. Forster, S.J. Mohan. Springer Science+Business Media, 2009. – P. 47–64.
3. Foroughi-Wehr B., Friedt W., Wenzel G. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. // *Theor. Appl. Genet.* – 1982. – 62. – P. 233–239.
4. Батыгіна Т.Б. Хлебное зерно / Отв. ред. М.С. Яковлев. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
5. Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture // *Annales Agr. Finnie.* – 1986. – 25. – P. 127–133.
6. Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // *Agricultural and food Science in Finland.* – 1998. – 6. – P. 389–398.
7. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2007. – 39, № 2. – С. 136–143.
8. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя на средах с химически модифицированными крахмалами // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2012. – 44, № 5. – С.440–448.
9. Белинская Е.В., Тымчук С.М., Дульнев П.Г., Дерезинова О.Ю. Использование высокоамилозного крахмала в питательной среде для культивирования пыльников ячменя // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2009. – 41, № 6. – С. 539–546.
10. Білинська О.В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su*<sub>2</sub>) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* // *Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія.* – 2010. – Вип. 11 (№ 905). – С. 60–65.
11. Білинська О.В., Тимчук С.М., Дерезинова О.Ю. Штучне живильне середовище для отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Патент України на винахід № 103426 від 10.10.2013. Бюл. № 19.
12. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 19 с.

#### **BILYNSKA O.V.<sup>1</sup>, DULNYEV P.G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Yurjev Plant Production Institute of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av., 142, e-mail: bilinska@ukr.net*

<sup>2</sup> *Institute of bioorganic and oil chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske h., 50, e-mail: selit@ua.fm*

#### **EFFECT OF MEDIUM GELATINIZED COMPONENT ON THE EFFICIENCY OF SPRING BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) HAPLOID PRODUCTION IN ANTHER CULTURE *IN VITRO***

**Aims.** Nutrient media for plant cell, tissue and organ culture include numerous substances of different chemical nature and biological activity. Among them gelatinized component of solid media presented as a rule by agar isn't considered to be the most decisive factor of morphogenesis *in vitro* promotion. However, it was demonstrated very interesting effect of starch solidified media to stimulate a direct embryoidogenesis

and improve plant regeneration in barley anther culture *in vitro*. Investigations aimed to evaluate the efficiency of agar substitution for new preparation of chemically modified starch D-5aM in medium for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. **Methods.** Plants were grown under field conditions. Anthers were isolated from spikes of F<sub>1</sub> hybrids of five combinations and two model genotypes. Inductive media were differed by gelling component. Control contained agar, two experimental variants included chemically modified starch D-5aM at two concentrations. **Results.** There has been conformed positive effect of agar substitution for less costly chemically modified starch on direct embryo formation and regeneration efficiency. It was revealed that lower concentration of starch decrease regeneration frequency in high responsive genotype and at the same time increased that one in cultivar possessing low androgenic capacity. **Conclusions.** Obtained data indicate advantage of chemically modified starch in comparison with agar. Perspective preparation D-5aM is recommended for application in plant biotechnology. **Key words:** *Hordeum vulgare* L., barley, anther culture *in vitro*, nutrient media, agar, chemically modified starch, morphogenesis.

УДК 633.791:575.113

ВЕНГЕР А.М., ВОЛКОВА Н.Е.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: venger87@ukr.net

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТИПУ СОРТУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО ЗА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ

Хмель звичайний *Humulus lupulus* L. – важлива сільськогосподарська культура, що використовується у харчовій, медичній та парфумерній галузях. Господарське значення хмелю звичайного обумовлене в більшій мірі наявністю в шишках гірких  $\alpha$ - і  $\beta$ -кислот та ароматичних речовин – пренілфлавоноїдів. Синтез даних речовин каталізується ферментами халконсинтазами. У хмелю звичайного відомо п'ять халконсинтаз – халконсинтаза 1 (CHS<sub>H1</sub>), халконсинтаза 2 (CHS<sub>2</sub>), халконсинтаза 3 (CHS<sub>3</sub>), халконсинтаза 4 (CHS<sub>4</sub>) та валерофенонсинтаза (VPS), що кодуються генами *chs\_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, відповідно [1].

При визначенні типу сорту хмелю (гіркий або ароматичний) використовують кількість гірких кислот (табл.) та ефірної олії. Пренілфлавоноїди та  $\alpha$ - і  $\beta$ -кислоти не є прекурсорами ефірної олії, проте рівень  $\alpha$ - і  $\beta$ -смол (похідних  $\alpha$ - і  $\beta$ -кислот) прямо пов'язаний з рівнем ефірної олії [2]. Визначення рівня  $\alpha$ - та  $\beta$ -кислот проводиться методами газової та

високоєфективної рідинної хроматографії, яка є дорогою та довготривалою процедурою [3].

Незважаючи на значний обсяг молекулярно-генетичних досліджень геному хмелю з використанням різних видів ДНК-маркерів, огляд літератури показав відсутність робіт, присвячених розробці молекулярних маркерів для ідентифікації типу сорта. Тому мета даної роботи полягала в оцінюванні можливості ідентифікації типу сорта за молекулярними маркерами генів *chs\_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного.

#### Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували 20 сортів хмелю звичайного селекції Інститута сільського господарства Полісся НААН, для яких визначено тип сорту: гіркі сорти – Альта, Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Промінь, Чаклун; ароматичні сорти – Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18, Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав.

Таблиця. Біохімічні критерії визначення типу хмелю [2]

Показник	Тип сорту	
	ароматичний	гіркий
Масова доля когумулолу в складі $\alpha$ -кислот, %	< 30	> 30
Масова доля колупулолу в складі $\beta$ -кислот, %	< 50	> 50
Співвідношення кількості $\beta$ -кислот до $\alpha$ -кислот, %	> 0,9	< 0,7